

FECUNDACIÓ IN VITRO

ANNA VEIGA

Institut Dexeus. Barcelona

Indicacions F.I.V.

Des del naixement, el 1978, del primer nadó obtingut per fertilització *in vitro* (F.I.V.), nombrosos equips de tot el món tracten un gran nombre de parelles als quals cal aquesta tècnica per aconseguir un embaràs. Les indicacions per portar a terme una F.I.V. són les següents:

- Factor tubàric (absència o alteració de les trompes)
- Factor masculí (oligospèrmies, astenospèrmies)
- Factor immunològic (incompatibilitat moc-semen)
- Esterilitat sense diagnòstic

Tractament inductor

Tota pacient que serà sotmesa a F.I.V. ha de ser tractada, en aquest cicle, amb inductors de l'ovulació de cara a obtenir una resposta multifol·licular de l'ovari per tal d'aconseguir un gran nombre d'ovòcits que, després de ser fecundats, donaran un percentatge més alt d'embaràs per cicle.

Els tractaments més utilitzats són:

- Clomifèn (citrat de) i gonadotrofines humanes (HMG-HCG)
- Gonadotrofines
- GnRH + gonadotrofines (detallat més endavant)

Control del cicle

El control d'aquests tractaments es porta a terme mitjançant determinacions diàries d'E₂ en plasma, LH en orina (cada tres hores) i ultrasons.

El nivell d'estradiol i les dimensions dels fol·licles ens informaran cada dia de la resposta individual de cada pacient i ens permetran adequar el tractament a cadascuna d'elles.

Les determinacions de LH en orina (cada tres hores) permetran detectar un augment endogen de LH que desencadenarà l'ovulació i, per tant, ens indicarà el moment en el qual hem de realitzar la recuperació dels ovòcits.

Normalment, i abans que es produeixi aquest pic de LH, s'administren 5.000 Ui d'HCG per provocar l'ovulació i programar, així, la intervenció.

Recuperació dels ovòcits

Fins fa uns anys, l'única via d'obtenció dels gàmetes femenins era l'endoscòpia: calia realitzar una laparoscòpia amb anestèsia general per tal de visualitzar l'aparell genital intern i poder fer una punció, un a un, dels fol·licles i obtenir els ovòcits produïts durant el cicle estimulat. Actualment, i gràcies als avenços tècnics en l'ecografia, es poden obtenir ovòcits sense necessitat de portar a terme una intervenció quirúrgica (per senzilla que sembli la laparoscòpia es tracta d'una intervenció).

La majoria d'equips que treballen en F.I.V. utilitzen majoritàriament la punció ecogràfica per a la recuperació dels ovòcits.

Els ovaris estimulats són visualitzats en la pantalla de l'ecògraf i se'ls fa directament una punció per via transvesical o transvaginal. Això suposa més comoditat per a la pacient, ja que només cal sotmetre-la a anestèsia local (peridural en el nostre cas) i no ha de quedar ingressada a l'hospital després de la punció. D'altra banda, aquesta tècnica ha constituït una reducció dels costos de la F.I.V., a la vegada que l'ha simplificada.

Identificació dels ovòcits

Els líquids fol·liculars obtinguts en la punció (ja sigui en la laparoscòpia o en la punció ecogràfica) són remesos al laboratori de F.I.V., el qual cal que es trobi al costat del quiròfan on es realitza la punció per tal d'evitar, en la transferència, el transport dels ovòcits i més endavant dels embrions.

Aquests líquids, clarament marcats, són examinats a l'esteromicroscopi, en condicions estèrils (campana de flux laminar, gorra, mascareta) per localitzar els ovòcits que continguin. Un cop identificat l'ovòcit, es procedeix a rentar-lo de les restes de sang i líquid fol·licular i, posteriorment, és classificat d'acord amb els criteris següents:

- Ovòcit +: Ovòcit immadur, sense cúmul oòfor, sense corona radiada normalment. Acostuma a estar en vesícula germinal.
- Ovòcit ++: Ovòcit immadur, amb poc cúmul i corona mal estructurada. Metafase I.
- Ovòcit +++: Ovòcit madur, acostuma a anar acompanyat de cúmul abundant i corona ben estructurada. Acostuma a estar en Metafase II.
- Ovòcit hipermadur: Cúmul grumollós i obscur, corona grumollosa. Sol ser causat per una llarga exposició a les gonadotrofines.
- Ovòcit atrésic o degenerat: Pot tenir o no cúmul oòfor normal; sol ser deforme i amb citoplasma obscur.

També es poden obtenir zones pel·lúcides fracturades amb restes de citoplasma de l'ovòcit que no ens seran de cap utilitat. Un cop classificat l'ovòcit, és col·locat en plaques o tubs amb medi de cultiu (Ham F₁₀, Earles, Menezo B₂ o B₃) en la incubadora que manté una temperatura de 37° C, una humitat del 85% i el 5% de CO₂ en aire.

Preparació de la mostra de semen

Un cop s'han obtingut els ovòcits cal procedir a la preparació de la mostra de semen que ha estat obtinguda per masturbació en recipient estèril.

Hi ha diverses tècniques per a la preparació del semen i totes pretenen separar els espermatozoides més mòbils perquè siguin utilitzats en la inseminació dels ovòcits. La més utilitzada, sobretot si es tracta d'una mostra normal, és la tècnica *swim-up*, la qual després d'un o diversos rentats i centrifugats de la mostra, permet que els espermatozoides més mòbils se separin del *pellet* i «nedin» en el sobrenedant d'on són recuperats per a la inseminació. Cada ovòcit és inseminat amb aproximadament 100.000 espermatozoides mòbils.

Fertilització

Entre 18 i 20 hores després de la inseminació es porta a terme l'observació dels ovòcits per comprovar si s'ha produït o no fertilització. Aquesta es posa de manifest en aquest moment amb la presència de dos pronúclis i/o dos corpuscles polars. Cal alliberar l'ovòcit de les cel·lules del cúmul que l'envolten i que no han estat disgregades pels enzims espermàtics per poder visualitzar aquestes estructures. També en aquest moment es poden observar més de dos pronúclis, signe clar de polispermia, o bé ovòcits no fecundats, amb un sol corpuscle polar.

Els zigots normals són canviats en mitjà de cultiu fresc i es mantenen a l'incubador fins el moment de la transferència.

Transferència

Entre 42 i 48 hores després de la inseminació se sol realitzar la transferència. En aquest moment els embrions acostumen a estar en estadi de 2-4 cel·lules tot i que el ritme de divisió varia d'un embrió a un altre; els de ritme de divisió ràpida són més favorables quant a pronòstic d'embaràs. La qualitat de l'embrió (I, II, III, IV) també sembla que és un factor determinant de l'embaràs.

Un màxim de 3 o 4 embrions es transfereixen a l'úter i la resta es congela per realitzar transferències posteriors si la primera no té èxit. Aquests embrions es carreguen en un catèter fi que disposa d'una beina més rígida que permet canalitzar l'orifici cervical intern sense complicacions. Aquest catèter és introduït a través del cervix fins aproximadament un cm del fons uterí, on es disposen els embrions.

El primer control per determinar si s'ha produït o no l'embaràs es realitza mitjançant determinació d'HCG en orina o β HCG en plasma 14 dies després de la punció.

Nous aspectes de la F.I.V.

Congelació d'embrions

La inducció de l'ovulació s'utilitza de forma generalitzada en F.I.V. i, per tant, s'aconsegueix un desenvolupament multifol·licular en moltes de les pacients sotmeses a aquests tractaments.

S'insemina un gran nombre d'ovòcits i s'obté un gran nombre d'embrions en aquestes pacients. S'ha demostrat que la taxa d'embaràs s'incrementa amb el nombre d'embrions transferits i sembla que el nombre idoni d'embrions a transferir per aconseguir una alta taxa d'embaràs i, d'altra banda, evitar embarassos múltiples, és de tres.

La congelació d'embrions s'ha convertit en una tècnica molt útil quan hi ha més de 3 o 4 embrions per pacient.

S'han publicat diferents mètodes de congelació i els procediments se simplifiquen i es fan més adaptables als programes de F.I.V. El mètode publicat per Lasalle i altres i els resultats de Testart ens animaren a incloure el mètode francès de congelació en el nostre programa de F.I.V..

Característiques tècniques

Els crioprotectors utilitzats són el propilenglicol (1.5M) i la sacarosa (1.0M).

Es congelen embrions en estadis de 2 pronuclis, 2 cèl·lules i 4 cèl·lules, intentant evitar estadis intermedis atesos els mals resultats obtinguts per l'equip pioner. Els embrions són carregats en palletes de plàstic (0.25 ml IMV, França) i el procés de congelació (congelació lenta) és realitzat per un congelador Minicool As 25 amb *seeding* automàtic.

Les palletes clarament identificades són emmagatzemades en nitrogen líquid i les pacients que disposen d'embrions congelats se n'han de responsabilitzar com a màxim sis mesos després de la transferència en fresc, augmentat a un any si s'aconsegueix l'embaràs en aquesta primera transferència.

Per a la descongelació, es monitoritza el dia de la transferència mitjançant determinacions diàries d'E₂ en plasma, ultrasons i determinacions urinàries de LH cada tres hores.

La descongelació és ràpida i els embrions són transferits sincrònicament d'acord amb el seu estadi en el moment de la congelació. Així doncs, els embrions en pronuclis són transferits 46-50 hores després de l'inici del pic de LH i els embrions en 2-4 cèl·lules 80-96 hores després de l'inici del pic de LH.

Només es transfereixen embrions amb un 25% o més d'embrions intactes. Es mantenen en cultiu en Menezo B₂ d'1 a 4 hores abans de la transferència en 50% de sèrum matern. Actualment, els embrions en pronuclis són mantinguts 24 hores aproximadament en cultiu i són transferits ja en 2 o 4 cèl·lules.

Els resultats obtinguts fins al febrer de 1988 apunten cap a un 72,5% de supervivència (25% de blastòmers intactes després de la descongelació); la probabilitat d'embaràs per embrió descongelat és de 5,7% i la d'embaràs per transferència de 9,6%

Cal destacar que el primer embaràs aconseguit en el nostre programa fou el resultat de la transferència d'un embrió que havia estat congelat en 4 cèl·lules, de les quals una sola resistí la descongelació. De moment és l'únic cas en la bibliografia d'embaràs amb un embrió d'aquestes característiques.

Estudis cromosòmics en ovòcits i embrions

Les anomalies cromosòmiques són un factor important en la pèrdua embrionària i fetal així com en l'esterilitat i la infertilitat masculines. Actualment encara hi ha poques dades sobre la incidència d'anomalies cromosòmiques en ovòcits i embrions i la fecundació *in vitro* representa un dels pocs mitjans per portar a terme aquest tipus d'estudis. Els ovòcits

aparentment no fecundats així com els zigots degenerats es processen directament per estudiar els complements cromosòmics. Els ovòcits polipenetrats s'incuben prèviament durant 18-20 hores en el medi habitual amb 10^{-7} M de sulfat de Vimblastina.

Les preparacions cromosòmiques es porten a terme mitjançant una modificació del mètode de Tarkowsky 1966.

Després d'un xoc hipotònic en 75 mM de KCl, els ovòcits són transferits a un portaobjectes i fixats amb diverses gotes de metanol-àcid acètic (3:1). S'utilitza Giemsa al 10% en tampó Sorensen per a la tinció (6-10 min.). Algunes preparacions són bandejades amb la tècnica de Bandes G.

L'eficàcia de la tècnica oscil·la entre el 55 i el 65%. Per calcular la incidència de l'aneuploidia només tenim en compte les preparacions d'hiperhaploidia.

En la nostra sèrie, la taxa d'aneuploidia (X^2 de la hiperploïdia) és de 22,2%, i és destacable l'existència d'ovòcits no reduïts (6,83%). Hem observat també fragmentació cromosòmica en Metafase II (4,3%). Per tant, el percentatge d'ovòcits anormals és de 26,4%. Aquest alt índex pot ser degut a diversos factors:

- Sobremaduració i degeneració dels ovòcits tot i que la manipulació i el cultiu no augmenten la taxa d'anomalies cromosòmiques.
- L'edat materna elevada és un factor important en la producció d'anomalies cromosòmiques. L'edat de les pacients que se sotmeten a FIV acostuma a ser elevada si la comparem amb la població normal, sobretot en els primers anys d'un programa.
- La inducció de l'ovulació pot ser responsable d'anomalies cromosòmiques.

És important destacar que alguns zigots detinguts (2,54%) foren classificats com ovòcits no fertilitzats i solament l'anàlisi cromosòmica pogué decidir el pronòstic del cas i la possibilitat o no de repetir un cicle de F.I.V.

Utilització d'agonistes de GnRh en l'estimulació per a F.I.V.

Des de l'inici de les tècniques de F.I.V. s'han emprat diversos esquemes terapèutics adreçats a obtenir una sobrestimulació de l'ovulació que produís un nombre més elevat d'ovòcits, d'embrions i, com a conseqüència, una taxa més gran d'embarassos. Tanmateix, a la pràctica les coses no sempre són tan clares ja que en l'humà la interferència entre les pròpies gonadotropines i les exògenes que administrem es tradueix en:

- a) Nivells oscil·lants de LH
- b) Ascens endogen de LH
- c) Luteïnitació fol·licular prematura
- d) Atrèsia fol·licular
- e) Anomalies de maduresa de l'ovòcit
- f) Alt percentatge de pacients descartades (15-30%)

L'administració perllongada d'agonistes de Gn-Rh pot inhibir aquesta secreció endògena i crear una situació hipogonadotropa que anomenem «hipofisectomia mèdica reversible».

La buserelina és un nonapeptid derivat del Lh-Rh en el qual s'han substituït la glicina-6 i la glicina-10 per una D-serina i per un grup etilamida respectivament. Aquests canvis fan que la molècula de buserelina tingui una més gran afinitat pel receptor de membrana hipofítica i més resistència a la degradació enzimàtica. Per tot això augmenta l'activitat biològica i la vida mitjana de la buserelina respecte a l'hormona natural.

L'administració aguda de buserelina provoca una estimació inicial dels receptors hipofítics que produeixen un augment de la secreció de LH i FSH (fase d'estimulació o de *flare-up*). Seguidament es produirà la dessensibilització dels receptors hipofítics que induirà la disminució de la secreció de FSH i LH (fase d'inhibició). Cronològicament, l'administració de buserelina pot ser prèvia a les gonadotropines i posteriorment simultània (protocol llarg), o bé és simultània des d'un principi l'administració buserelina i gonadotropines (protocol curt).

Tots els autors europeus i els nostres resultats coincideixen en un més gran percentatge d'embarassos obtinguts per F.I.V. sota supressió hipofítica amb agonistes del Gn-Rh, tot i que no és definitiu el per què d'aquest increment en la taxa d'embaràs.

Alguns grups han comprovat nivells lútics de progesterona més alts i estradiol més baix en els cicles de buserelina, i s'hi ha atribuït l'increment en la taxa d'embaràs.

Per tant, sembla que el factor determinant de l'augment de la taxa d'embaràs amb aquests tipus d'embaràs és una millor qualitat de l'endometri.

El nombre d'ovòcits obtinguts és quasi sempre més gran que amb altres tractaments tot i que la seva qualitat és inferior, i el mateix passa amb els embrions, fet que es posa de manifest, entre altres coses, en un descens de la supervivència en la descongelació dels embrions aconseguits després de Gn-Rh.

Resultats FIV-SRH

Institut Dexeus.

Desembre 1982 Juny 1987

	Nom	%
Nombre de pacients	1.713	
Nombre de pacients descartats	548	31
Nombre de puncions fol·liculars	1.165	
Laparoscòpia	948	81
Punció ecogràfica	217	19
Nombre de laparotomies	3	0,2
Nombre de recuperacions positives (≥ 1 ovòcit)	1.146	98
Nombre d'ovòcits	4.680	
Nombre d'ovòcits / pacient	4	
Qualitat dels ovòcits:		
Madurs	4.269	92
Immadurs	175	3
Degenerats	236	5
Ovòcits fertilitzats	2.400	52 (ovòcits)
57 % dels ovòcits madurs		
Ovòcits polispermics	93	3 (dels o. fertilitzats)
Contaminacions	42	3 (de les puncions)
Divisió normal	2.110	87,7 (dels ovòcits fertilitzats)
Transferències	852	50,23 (de les pacients)
		77,1 (de les puncions)
Embarassos	114	6,65 (de les pacients)
		9,78 (de les puncions)
		13,37 (de les transferències)
Avortaments	23	20,17 (dels embarassos)

Bibliografia

1. EDWARDS RG i PURDY JM (1982). Human conception in vitro. Ed. Academic Press. Londres.
2. FEICHTINGER W i KEMETER P (1987). Future aspects in human in vitro fertilization. Ed. Springer Verlag. Berlin.
3. TESTART J i FRYDMAN R (1985). Human in vitro fertilization. Actual problems and prospects. Ed. Elsevier Science Pub. Amsterdam.
4. VEIGA A, CALDERÓN G, BARRI PN, COROLEU B (1987). Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with < 50% intact blastomeres. Human Reproduction, 2/4: 321-32.
5. VEIGA A, CALDERÓN G, SANTALÓ J, BARRI PN i EGOZCUE J (1987). Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programme. Human Reproduction, 2/5: 425-30.